

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE GUADALAJARA

INCORPORADA A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA DE BIOLOGIA



TESIS CON
FALTA DE ORIGEN

ANALISIS DE LA VIABILIDAD DE LA LEVADURA Saccharomyces cerevisiae
Hansen OBTENIDA A PARTIR DE FONDAJES DE FERMENTACION
ALCOHOLICA DE TEQUILA, POR MEDIO DE SU
CAPACIDAD FERMENTATIVA.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

BIOLOGO

PRESENTA:

LUIS MIGUEL CASAS DE LA PEÑA

GUADALAJARA, JALISCO., AGOSTO DE 1988.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

INDICE

ABSTRACT	pag..1
INTRODUCCION	pag..2
REVISION BIBLIOGRAFICA	pag..7
MATERIAL Y METODOS	pag.10
RESULTADOS	pag.13
DISCUSION	pag.16
CONCLUSIONES	pag.26
RECOMENDACIONES	pag.28
RESUMEN	pag.29
APENDICE (TABLAS)	pag.30
BIBLIOGRAFIA	pag.32

ABSTRACT

THE FERMENTATIVE CAPABILITY OF THE YEAST *Saccharomyces cerevisiae* HANSEN FROM THE SOLID RESIDUES OF BATCH CULTURE FERMENTATIONS OF TEQUILA WAS MEASURED UNDER LABORATORY CONDITIONS, IN ORDER TO STUDY THE POSSIBILITY OF REUTILIZING THE YEAST FOR INDUSTRIAL FERMENTATION PROCESSES. FERMENTATIVE EFFICIENCY OF THE YEAST FROM THE RESIDUES WAS FOUND TO BE SIGNIFICANTLY DIFFERENT, IN STATISTICAL TERMS, WITH RESPECT TO FRESH INOCULUM YEAST USED IN THE ACTUAL BATCH CULTURE FERMENTATION PROCESS. THE AVERAGE EFFICIENCY OF THE YEAST FROM THE RESIDUES WAS 10% LOWER COMPARED TO FRESH YEAST AVERAGE YIELDS. THE YEAST FROM THE RESIDUES WAS FOUND TO CONTAIN A HIGH PROPORTION OF STOPS. THEREFORE, FURTHER STUDIES SHOULD BE CARRIED OUT BEFORE REUTILIZATION OF RESIDUAL YEAST FOR TEQUILA FERMENTATION BE RECOMMENDED. A REVISION OF ALTERNATIVE USES FOR THE YEAST IS PRESENTED.

INTRODUCCION

Una de las principales industrias, no solamente de Jalisco sino de todo México, es la del tequila. Aunque se ha visto afectada por la grave situación económica del país, que se agudizó notablemente a partir del bienio 1982-83, sigue representando una actividad vigorosa y en la actualidad experimenta un repunte. Según datos proporcionados por el Presidente de la Cámara Regional de la Industria del Tequila, Lic. Francisco J. González García (Comunicación personal), hacia 1983 se consumían anualmente unos 33 millones de litros de tequila por el mercado interno y, aunque todavía no se alcanzan esos niveles, durante el año de 1987 hubo una recuperación del 67% en el consumo nacional, lo cual representó la venta de casi 23 millones de litros. Asimismo reporta que se espera que en 1988 se superen en un mínimo de 15% las ventas en el mercado externo con respecto al año de 1987, las cuales representaron 33 millones de dólares, equivalentes a una igual cantidad de litros vendidos. Esto significa veinte años de crecimiento sostenido entre los productos mexicanos de exportación.

Junto con el cognac y el champagne, el tequila es una de las pocas bebidas a las que se les concede la denominación de origen, que le fue otorgada en 1974, por lo que solamente puede producirse en Jalisco, constituyendo uno de los productos más característicos de México. Por esta misma razón, el tequila no tiene que competir en el exterior con otros productos de su género, como en el caso del ron y de otras bebidas destiladas, que pueden elaborarse en cualquier parte del mundo, lo cual constituye un importantísimo monopolio mexicano que asegura una fuente considerable de divisas.

Por todo lo anterior, resulta evidente que la industria tequilera, además de elaborar uno de los productos más típicos de México, constituye una actividad económica de primera importancia vinculada a las tradiciones de Jalisco.

No obstante, no existen muchos estudios sobre las características del proceso de elaboración del tequila. Esto podría deberse posiblemente a que los procedimientos actuales usados para la fabricación del tequila son una combinación de los procesos tradicionales de elaboración utilizados originalmente por los habitantes del pueblo del Tequila y de las regiones vecinas, y de modernas técnicas industriales diseñadas para la elaboración de otros licores.

En otras palabras, los procesos que se emplean hoy en día son el resultado de la adaptación de técnicas de producción masiva a un procedimiento originalmente artesanal e incluso casero. Este fenómeno adaptativo aún no concluye, lo cual se traduce en oportunidades para introducir mejoras y optimizar el procedimiento industrial. Tal refinamiento en las técnicas de producción deberá conducir a una elevada eficiencia y a una reducción en los costos, con lo que se incrementaría aún más la rentabilidad de la industria. El presente estudio tiene como finalidad contribuir al mencionado refinamiento.

El proceso de la elaboración del tequila se divide en cuatro partes principales. La primera consiste en el cocimiento de las cabezas de agave en autoclaves durante unas 24 horas a 110°C. La segunda parte consiste en la molienda de las cabezas para obtener el jugo fermentable. El tercer paso corresponde a la fermentación del jugo para conse-

guir un mosto con una graduación alcohólica de entre 6° y 7° Gay Lussac. Finalmente se realiza una doble destilación para dar al tequila su graduación alcohólica final de unos 55° Gay Lussac. Guzmán (1982) describe detalladamente el proceso de la elaboración del tequila, mientras que Sánchez (1980) hace una descripción más general.

El presente trabajo se centra sobre la tercera parte del proceso; esto es, la fermentación. Esta es llevada a cabo por *Saccharomyces cerevisiae* Hansen, una levadura del grupo de los hemiascomicetos. Su empleo se remonta a muchos siglos atrás, hasta la fermentación del mosto de uva para obtener vino en el Oriente Medio. Diversas variedades han sido desarrolladas con el objeto de llevar a cabo la fermentación de distintos sustratos, que ofrecerán en cada caso una bebida alcohólica con propiedades organolépticas peculiares. A través de la selección de cepas, en combinación con el tipo de sustrato utilizado, se hace variar el balance de los distintos compuestos generados durante la fermentación (Mendoza, 1977). Lo anterior se traduce, entre otras cosas, en el sabor y bouquet característico, no sólo de un tipo de bebida, sino de una marca, reserva o tipo; el tequila no constituye una excepción (Castrillo, comunicación personal). Por lo mismo se deduce que es necesario un control biológico estricto sobre las propiedades metabólicas de la levadura a utilizarse durante la fermentación, para mantener uníforme las características del producto (Mendoza, 1977; Sánchez, 1980; Avalos, 1982).

Para preservar las propiedades metabólicas de la levadura se tienen almacenadas cepas refrigeradas y cepas deshidratadas que se utilizan como fuente de inóculo para el mosto. Mendoza (1977) y Avalos (1982)

reportan las condiciones óptimas para el desarrollo de cepas de levadura para la producción de tequila, mientras que Rubio y Lamas (1978) describen un estudio sobre levaduras de alta fermentación para la producción de alcohol en general.

Para realizar el inóculo de la levadura en los tanques industriales es necesario desarrollar una población de levadura desde medios de cultivo de laboratorio, partiendo de unos cuantos mililitros hasta alcanzar los volúmenes de varios miles de litros que finalmente se agregan al mosto a fermentar. Contrillo (Comunicación personal) señala que el volumen de cultivo que se agrega a un tanque típico de 70 000 l corresponde a un 8.5% de ese volumen; es decir, a unos 5 960 l de cultivo a una densidad de entre 250×10^6 y 400×10^6 células de levadura por centímetro cúbico, o sean, 1.475×10^{15} - 2.38×10^{15} células de levadura por cada tanque. Alimentar a una población de esa magnitud tiene un costo muy elevado; a la levadura se le proporciona como alimento una gran cantidad de meladura y jugos de agave (Avalos, 1982; Contrillo comunicación personal), materias primas que se restan de la producción total. Y al final de la fermentación, cuando los azúcares ya fermentados y convertidos en alcohol se separan para ser destilados, queda un residuo sólido en la parte inferior del tanque, el cual recibe el nombre de "fondaje". Dicho residuo o fondaje consiste de células de levadura, que se precipitan después de la fermentación, y de bagacillo de agave. El peso aproximado de dicho residuo asciende, en promedio, a aproximadamente 500 kg, de los cuales más de un 85% corresponde a células de levadura (Guzmán, 1982). Dicho residuo se considera, para fines prácticos, como un desecho industrial y no se aprovecha, sino que sencillamente se elimina al final del proceso de fermentación.

El hecho de que el fondaje se tire plantea la necesidad de reducir el gasto generado por la producción de una nueva población de levadura por cada ciclo de fermentación, lo cual, en principio, podría lograrse al reutilizar la levadura de los fondajes para llevar a cabo al menos otro ciclo de fermentación.

*,

La hipótesis principal de este trabajo consiste precisamente en que la levadura de los fondajes retiene la capacidad fermentativa después de atravesar el proceso de fermentación en tanque. Subsidiariamente se plantea que la levadura puede ser destinada a otros usos.

Aunque en apariencia resulta simple reincorporar la levadura al proceso, existen varios factores que limitan la aplicación de tal solución. La condición de la levadura determinará su destino final, ya sea dentro o fuera del proceso. Por lo anterior, el presente trabajo tiene por objetivos:

1. Analizar la viabilidad de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* obtenida a partir de fondajes provenientes de la fermentación alcohólica del tequila, mediante el estudio de la capacidad fermentativa (metabolismo anaeróbico) de la misma.
2. Proponer usos alternativos para la levadura.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Saccharomyces cerevisiae Hansen fue descrita a partir de muestras de levadura obtenidas de cervecerías de Londres y Edimburgo y se conocen varias especies afines muy parecidas (Guilliermond, 1919).

Existe una gran cantidad de trabajos relativos al empleo de *Saccharomyces cerevisiae* para la transformación de distintos sustratos en bebidas alcohólicas (Rose & Harrison, 1971).

La mayoría de las referencias encontradas se relacionan con las condiciones y parámetros que afectan el rendimiento de la levadura y provienen, en su mayor parte, de estudios realizados en la industria cervecera, como los trabajos de Casida (1968), Hanners (1971), Bryant & Cowan (1979), Bull (1978), Omaka (1985) y Guillot (1986a, 1986b). A pesar de esto, encontramos algunos trabajos que tratan sobre la producción de otros licores, como en el caso de Soumalainen & Oora (1971) quienes obtienen sus datos a partir de estudios sobre vodka, y como en el caso de Mendoza (1977), Rubio & Lamas (1978), Sánchez (1980), Avallón (1982) y Gurmán (1982), quienes realizaron estudios sobre la producción de tequila. Otros estudios importantes proceden del campo de la enología (Rankine, 1978).

Las características más relevantes al proceso de fermentación que se mencionan son: La temperatura (Rose & Harrison, 1971; Nagodawithana *et al.*, 1974; Ivanova *et al.*, 1975; Jagdish & Carter, 1978; Rosen, 1978), la concentración inicial del inóculo (Casida, 1968; Nagodawithana *et al.*, 1974; Castrillo, comunicación personal), características del sustrato

trato fermentable (Guilliermond, 1919; Casida, 1968; Rowe & Harrison, 1971; Suomalainen & Oora, 1971; Nagodawithana *et al.*, 1974; Bull, 1978; Rosen, 1978), la concentración inicial de azúcares fermentables (Queiroz & Valro, 1981; Rose & Harrison, 1971) y concentración de sales minerales (Casida, 1968; Rose & Harrison, 1969).

En cuanto al reciclaje o reutilización de la levadura dentro del proceso de fermentación, encontramos varios sistemas que proveen la reutilización del material, aunque en su mayoría se refieren a sistemas continuos sumamente sofisticados (Rosen, 1978) y que en muchos casos utilizan una levadura diferente a *Saccharomyces cerevisiae* (Guldioni, 1984; Janssens & Bernard, 1984; Shay, 1985; Cho, 1986). Existen reportes sobre la utilización prolongada de células y enzimas microbianas para la fermentación, pero se implica la inmovilización de las células o las enzimas sobre un sustrato específico (Navarro, 1981a y 1981b; Miyahira, 1984; Onaka, 1985).

El reporte más concreto que se encontró corresponde a la industria cervecera y describe un procedimiento adecuado para la reutilización de la levadura. Antes de ser usada como inóculo, la levadura de una fermentación previa es lavada (con ácido fosfórico, tartárico o persulfato de amonio) por sedimentación, un procedimiento que reduce el valor del pH a aproximadamente 2.5 y remueve una considerable cantidad de contaminantes microbianos, si se hallaran presentes. Así cada libra de levadura agregada a la fermentación durante el inóculo rinde aproximadamente de 3 a 4 libras de levadura líquida al cosechar, y la levadura que sobre y que no se requiere para un inóculo posterior se convierte en un producto secundario de la fermentación (Casida, 1968).

Además, existe una gran cantidad de referencias al uso de la levadura como fuente de proteína unicelular (Vossens Harris & Saeman, 1945; Peterson, 1945; Almazán, 1968; Matales & Tannenbaum, 1968; Birch y colaboradores, 1976; Eder, 1976; Norris, 1981; Moulin & Malige, 1983; Batt, 1984; Klausner, 1984; Saika, 1984; Gaillardin, 1987). De nuevo, la mayoría de los reportes encontrados corresponde a organismos diferentes a *Saccharomyces cerevisiae*, pero constituyen una buena guía sobre las características deseables para el proceso de obtención de proteína unicelular y de las propiedades adecuadas de la levadura que se utiliza. Asimismo, hay que resaltar que dan un panorama muy amplio sobre la posibilidad de implantar biotecnologías en México.

Algunos autores advierten sobre las consecuencias de la transferencia de escala en los procesos de fermentación (Fuch, 1971; Buckland, 1984). También es posible encontrar algunas referencias sobre las técnicas más convenientes para tratar a la levadura (Casida, 1968; Bull, 1978), aunque es necesario llevar a cabo una labor cuidadosa para su adaptación. Las normas oficiales para la regulación de las características del tequila se pueden encontrar en el Diario Oficial de la Federación del día Miércoles 19 de Abril de 1978 (Sánchez, 1980).

La levadura estudiada provino de muestras recogidas de los fondajes de fermentación del tequila de una planta en el municipio de Tequila, Jalisco. Las muestras, a su vez, fueron obtenidas por cuota, de acuerdo con el programa de fermentaciones establecido por dicha planta. Las muestras fueron recogidas en frascos previamente esterilizados de 1 l de capacidad. Todas las muestras fueron tomadas de la porción media del fondaje, a una profundidad aproximada de 30 cm.

Los frascos con las muestras fueron cerrados herméticamente y mantenidos en refrigeración hasta su transporte al laboratorio para su estudio. La temperatura de refrigeración fue de entre 2° y 4°C por un máximo de 36 h. Ronen (1970) reporta que tal tratamiento no afecta de manera adversa la viabilidad de la levadura.

Se determinó considerar al fondaje como equivalente directo de la levadura de control por las siguientes razones:

1. Guzmán (1982) reporta que la proporción de levadura en el fondaje es superior al 85%.
2. En un muestreo previo, el autor determinó una proporción de levadura en el fondaje de aproximadamente 98% sobre el total, siendo confirmado por Castrillo (Comunicación personal).
3. El procedimiento de separación de la levadura y el bagacillo de agave resultó ser muy complicado aún en el laboratorio, por lo que se ignoró el 2% correspondiente a la diferencia.
4. En vista de que se propone la aplicación industrial del proceso de reutilización, y a nivel industrial la separación de la leva-

dura y bagacillo resulta impráctica y costosa (Castrillo, comunicación personal), se consideró adecuado manejar el fondaje como equivalente adecuado para el estudio, en lugar de proceder a la separación de la muestra.

La determinación de la eficiencia fermentativa del fondaje se realizó comparando la capacidad de una cantidad equivalente en peso húmedo de levadura fresca de inóculo y de fondaje para llevar a cabo la fermentación de una solución de meladura (de idénticas características que las de la usada en el proceso industrial) aforada a un litro, dentro de un matraz Erlen-Meyer de 1 l de capacidad en condiciones asépticas, del cual se permitía el escape del CO_2 hacia una solución de sulfato de cobre (CuSO_4) a fin de evitar contaminación. La cantidad del inóculo correspondió a una solución de inóculo estándar de 85 ml para aforar a 1 l con una concentración aproximada promedio de 325×10^6 cfu lulas de levadura.

Para obtener equivalentes de fondaje y levadura fresca se utilizan pesos húmedos iguales, correspondientes a la cantidad de levadura contenida en 85 ml de solución de inóculo preparada para la fermentación de 1 l de sustrato fermentecible. Para la obtención del peso húmedo se realizó una curva de estabilización de centrifugado/peso (American Society For Microbiology, 1984), la cual se estabilizó a 3 500 rpm durante 10 minutos. Posteriormente se determinó el tiempo necesario de filtración al vacío con un filtro Whatmann # 4 para igualar el peso del equivalente del centrifugado, tanto para la levadura control como para la levadura problema. El peso se estabilizó en 7 minutos en 2 g de peso húmedo para completar el volumen de inóculo equivalente (v. supra).

Tanto a la solución del fondaje como a la de la levadura control se agregó 1 g de fosfato de amonio y 0.5 g del nutriente comercial denominado "Yeastex", para aportar los elementos necesarios para el crecimiento de la levadura.

Una vez preparados los inóculos control y problema, se agregaron al sustrato fermentecible, que se determinó a 14.5° Brix de sólidos totales disueltos. Tanto la composición como la graduación Brix de los experimentos correspondieron a las características del proceso en tanque.

Se evaluó la eficiencia de la fermentación al cabo de 72 h., tiempo que se determinó como necesario para completar el ciclo de fermentación bajo las condiciones experimentales descritas. Al término de las 72 h se determinaron los grados Brix de muerte de los mostos y se procedió a la destilación no fraccionada de los mismos para medir la graduación alcohólica de los mostos en grados Gay Lussac. Esta medición se ajustó al volumen inicial del mosto, descartando la pérdida de volumen por el escape del CO_2 , la cual resultó insignificante.

Todas las mediciones fueron acompañadas del registro de la temperatura, para poder llevar a cabo la corrección densimétrica de las lecturas de sólidos disueltos totales y contenido alcohólico, ya que ambas varían con la temperatura. Tal corrección se lleva a cabo mediante el empleo de tablas de ajuste disponibles comercialmente.

Para la evaluación estadística de los resultados se empleó la prueba t de Student, según el método descrito por Reyes (1985).

RESULTADOS

Para la obtención de los resultados que aparecen a continuación, fueron utilizadas 97 muestras del grupo experimental (es decir, el correspondiente a los fondajes) y 22 del grupo control (correspondiente a la levadura fresca). El resto de las muestras se desechó por no haber sido leídas dentro de las 72 h de iniciado el proceso de fermentación, puesto que ello dió lugar a la contaminación acética del material. La temperatura promedio de fermentación en los matraces fue de 26.5°C.

Como precaución, se comprobó que no existiera una diferencia estadísticamente significativa en la graduación Brix de los mostos de carga, tanto de los controles como de los experimentos. El promedio de la graduación Brix de carga de los controles fue de 14.619° y el de los experimentos de 14.625° ($t_n = 0.549$; $p > 0.05$).

La capacidad fermentativa de la levadura de los fondajes resultó, en todos los casos, inferior a la de la levadura control, como puede apreciarse en las tablas 1-6.

Se encontró una diferencia estadísticamente significativa en la reducción del contenido de azúcares disueltos en el mosto fermentado por el grupo problema y por el grupo control ($t_n = 41.070^{***}$; $p < 0.001$). La reducción promedio encontrada, medida en grados Brix (% de sacarosa disuelta en peso), fue de 13.01° para el caso de los controles y de 12.11° para los problemas (véanse tablas 2 y 4). Esto corresponde a una diferencia de 9.54% entre promedios de abatimiento de azúcares disueltos.

La eficiencia de fermentación, medida como la relación porcentual entre el abatimiento de azúcares (expresado en grados Brix) y el Brix del monto de carga, fue de 93.08% para el grupo control y de un 84.19% para el grupo experimental, ambas cifras en promedio. De acuerdo con el tratamiento estadístico, ésto arroja una diferencia altamente significativa entre los dos grupos ($t_n = 42.326^{***}$; $p < 0.001$).

El contenido alcohólico del destilado, expresado esta vez en grados Gay Lussac, fue de 5.91° para el mosto fermentado por la levadura control y de 5.34° para el mosto fermentado por el fondaje. Por lo tanto, la eficiencia comparativa del fondaje corresponde a un 90.42% de la obtenida por la levadura control. En términos estadísticos, también se encontró una diferencia altamente significativa ($t_n = 42.076^{***}$; $p < 0.001$).

Después de realizada la fermentación en el laboratorio, la levadura se asentó en el fondo de los matraces. En el caso de la levadura de inóculo fresco (es decir, la que había realizado la fermentación por primera vez), se encontró que el número de células muertas fue de alrededor de un 30%, y el número de células transformadas en ascas fue de aproximadamente 25%. La levadura utilizada por segunda vez (o sea, la proveniente de los fondajes), se distribuyó en dos capas: La capa superior de color café claro con un contenido de aproximadamente 20% de células muertas y 20% de ascas, mientras que el resto de las células se hallaba en estado vegetativo normal; y la capa inferior, de color gris, con un 75% de células muertas y 25% de ascas, aproximadamente. La capa superior equivalía a un 80% del volumen total del precipitado y la inferior a un 20%; es decir, había en total un 31% de células muertas y

20% de ascas, y 49% de células vivas, aproximadamente. Los valores que se encontraron para la levadura directamente extraída de los fondajes de los tanques fueron en promedio de 30% de ascas y 27% de células ya muertas. Esto significa una disminución del número de ascas, mas no de células muertas al atravesar los fondajes una segunda fermentación. No obstante, el aumento del número de células muertas no es muy grande.

DISCUSION

El estudio preliminar de la morfología de *Saccharomyces cerevisiae* corresponde con la descripción reportada por Ullua *et al* (1982), aunque es importante señalar que las características tales como el tamaño y la forma de las células son muy variables y pueden cambiar de una cepa a otra, e incluso dentro de una misma cepa o población, de acuerdo con la edad o las condiciones del cultivo, lo cual concuerda con lo reportado por Guillermond (1919) y confirmado por estudios más recientes (Rose & Harrison, 1969; Kazantsev, 1979).

La comparación de la eficiencia fermentativa de los fondajes y los controles no contempló la separación de las células muertas, debido a la dificultad de efectuar tal separación durante el proceso industrial. Sin embargo, esto no constituye una desventaja, puesto que las condiciones de experimentación reflejan las condiciones que tendrían lugar durante una nueva fermentación industrial en tanque. De esta manera, por motivos prácticos, el trabajo de laboratorio se basó en la posible aplicación industrial y no a la inversa. En otras palabras, el problema radica en buscar una solución práctica a la cuestión de la reutilización del fondaje, sin afectar demasiado las condiciones normales del proceso para no generar gastos adicionales.

Los rendimientos encontrados, tanto de producción de alcohol como de abatimiento de azúcares disueltos totales, se encuentran dentro de la gama reportada por Sánchez (1980), aunque los registros de rendimiento, y especialmente los correspondientes a los fondajes, se encuentran en la porción inferior de la mencionada gama. Esto podría deberse a con

centraciones iniciales de sustrato fermentable (es decir, azúcares) más altas en el mosto; esto es, a graduaciones Brix más elevadas en el mosto de carga, cosa que no aclara Sánchez (1980) en su reporte, dado que no establece una correlación biunívoca entre los datos que presenta.

Otros factores que podrían haber alterado el nivel del contenido alcohólico encontrado son los inherentes a la escala relativa del experimento, ya que muchos de los parámetros que tienen influencia sobre el comportamiento de los microorganismos cambian a medida que cambia la escala de operación (Fuch, 1971; Buckland, 1984). Un signo indicador de esto último lo constituye el hecho de que la temperatura promedio que alcanzó el mosto durante la fermentación en los matraces fue de tan sólo 26.5°C, probablemente como consecuencia de la elevada relación superficie/volumen de los matraces utilizados, en comparación con los tanques industriales de 70 000 l, en los cuales la temperatura se encuentra normalmente entre los 32° y los 37°C durante el proceso de fermentación (Sánchez, 1980; Castrillo, comunicación personal).

Aunque el incremento de temperatura puede deberse a la mayor dificultad para disipar calor en el caso de los tanques, es importante señalar que el calor es un subproducto generado por la actividad metabólica de la levadura y, por lo tanto, puede existir una correlación entre el tipo de metabolismo involucrado (que depende de la disponibilidad de oxígeno), el crecimiento de la población y el calor generado (Van Uden, 1971). La temperatura óptima de crecimiento reportada para *Saccharomyces cerevisiae* es de 30°C, mientras que la temperatura óptima de fermentación es de 40°C (Poon & Harrison, 1971). Las cepas utilizadas industrialmente trabajan adecuadamente a esta última temperatura (Castrillo,

comunicación personal). Los resultados obtenidos sugieren que la diferencia de temperaturas entre el proceso en tanque y las condiciones de laboratorio podrían dar cuenta de la diferencia de tiempo requerido para completar la fermentación: 36 h en el proceso industrial y 72 h en el caso del laboratorio.

Se sugiere que el control computarizado de los procesos de fermentación y adquisición de datos podrían tener un impacto positivo sobre todos los aspectos de la transferencia de escala (Buckland, 1984). Pero sería necesario implantar un costoso sistema *ad hoc*.

A pesar de que se encontró una diferencia estadísticamente significativa (véase *supra*) entre los resultados obtenidos mediante el empleo de la levadura control y el de los fondajes, tanto para el caso del abatimiento de la cantidad de azúcares disueltos como para el del rendimiento alcohólico en grados Gay Lussac, es importante hacer notar que la eficiencia fermentativa de los fondajes puede calificarse de buena, al menos bajo las condiciones de laboratorio, ya que la eficiencia del fondaje para obtener alcohol fue, en promedio, ligeramente superior al 90% de los rendimientos obtenidos mediante el uso de los controles. Este hecho debe estimular la realización de más estudios en el sentido de la reutilización de la levadura para llevar a cabo más de un ciclo de fermentación en tanque. El hecho de que se haya encontrado que la proporción de células de levadura muertas en los fondajes no fuera superior, aún después del segundo ciclo de fermentación en el laboratorio, al 11% del total de células refuerza la idea de que la levadura retiene su vigor fermentativo, puesto que en los sistemas de uso intensivo de levadura para fermentaciones rápidas, las tasas de muerte son cercanas al 90%

(Nagolawithana et al., 1974). A pesar de que los resultados parecen indicar tan sólo un ligero aumento de número de células muertas, y también una marcada disminución del número de ascas (de más del 50%), es necesario aclarar que la proporción de esporas es aún elevada, y que el aumento del número de células vivas puede muy bien ser atribuido a la disminución de las ascas; es decir, a que las esporas maduraron y se transformaron en células vegetativas.

A pesar de que existen evidencias de que la levadura esporulada resulta más vigorosa (Castrillo, comunicación personal), existen también motivos para considerar con cautela la reutilización de la levadura del fondaje, que a partir de los datos de la eficiencia comparativa resulta tan atractiva. La elevada proporción de esporas y la presencia de levadura proveniente de esporas complica la posible reutilización, en la medida que las esporas se forman dentro de ascas provenientes de la transformación de un cigoto que surge de la fusión de dos células (Moore-Landecker, 1982); esto es, hay una meiosis previa a la formación de las ascosporas (Rose & Harrison, 1969), lo cual da lugar a una recombinación de la información genética de la levadura que podría conducir a la eventual alteración de una o varias de las propiedades metabólicas de la cepa utilizada. La elevada tasa de esporulación de la levadura del fondaje es una consecuencia de las condiciones adversas del medio, tales como el relativamente alto contenido alcohólico del medio (Casida, 1968) y la escasez de nutrientes (Guilliermond, 1919; Casida, 1968; Rose & Harrison, 1971). En consecuencia, la esporulación constituye un medio para asegurar la continuidad de la población hasta la reanudación de condiciones favorables al crecimiento (Guilliermond, 1919; Rose & Harrison, 1969). Este fenómeno constituye también un mecanismo adaptativo útil para enfren

tar un medio más favorable, o bien un medio favorable de características diferentes a las del medio ambiente original, primero a través de la mayor resistencia de la espora a cambios y condiciones adversas y, después, mediante la aparición de una gama de nuevas propiedades no presentes en la población primitiva. No obstante ser ventajosa para la levadura, esta variabilidad genética constituye una desventaja real desde el punto de vista de su posible reutilización, ya que una variación espontánea de las propiedades metabólicas de la levadura podría afectar seriamente las características del tequila por ella producido (Henderson, 1977). Dentro de esta misma orden de ideas, hay que remarcar que lo adecuado sería reutilizar la levadura inmediatamente, ya que si bien el presente estudio no parece confirmar lo expuesto por Nagelawithana *et al* (1974) en el sentido de que el número de esporas y células muertas aumenta exponencialmente con el tiempo, esto podría deberse a que el proceso de degeneración normal de la levadura fue interrumpido al refrigerar la levadura, para después ser transferida a un medio más favorable que aquél de que fue tomada. Sin embargo, el presente estudio sí sugiere una tendencia de la levadura a deteriorarse seriamente en relación directa con el tiempo transcurrido (como lo demuestra la aparición de una capa de color gris con una elevadísima proporción de células ya muertas; véase *supra*); al menos en el caso de los fondos.

La proposición de Rosen (1978) de refrigerar la levadura previene en alguna medida la esporulación o el deterioro de la población, como se acaba de señalar, e incluso parece sugerir que tal refrigeración podría "revitalizar" a la levadura. Sin embargo, ésta trae consigo ciertos inconvenientes. Los más importantes radican en el almacenamiento y el gasto derivado de tal refrigeración, además de las complicaciones -

derivadas de la evacuación del fondaje del tanque y de su posterior regreso a él. En suma, los gastos derivados de tal operación podrían resultar más onerosos que el dispendio implícito en el desecho del fondaje. La escala de operación y las características de ingeniería del proceso son, además, muy diferentes a las de uso corriente en México para la obtención del tequila.

A pesar de que existen reportes sobre el uso de fermentaciones lagras y continuas, es difícil su aplicación en el caso del tequila, debido a que aquéllas se basan en el uso de células inmovilizadas de levadura (Kazantsev et al., 1979; Marwaha, 1984; Onaka, 1985) o en sistemas de fermentación continua que exigen un control instrumental riguroso (Guidoboni, 1984). Además, los procesos de fermentación continua traen consigo cambios en la morfología y fisiología de las células de levadura (Kazantsev et al., 1979). El proceso descrito por Jannens & Bernard (1984) tampoco resulta adecuado; no utiliza un sustrato diferente, un proceso continuo bajo control estricto y un organismo fermentador distinto en un sistema de condiciones semi-estables.

Casida (1968) no reporta problemas de esporulación en el proceso que describe para la reutilización de la levadura en las cervecerías, pero señala en cambio que siempre resulta un excedente de levadura en el proceso, por lo que constantemente hay un subproducto que procesar de algún modo, o bien, del cual hay que deshacerse a final de cuentas, y del que no se describe un modo directo de aprovechamiento.

Castrillo (Comunicación personal) reporta el inicio de experiencias de reutilización del fondaje en la fermentación a escala industrial.

trial, aunque con resultados moderados y algunas dificultades. Lo anterior parece reafirmar la hipótesis secundaria del presente estudio, ya confirmada provisionalmente por los resultados obtenidos durante su desarrollo. Sin embargo, es necesario llevar a cabo más pruebas y someter los resultados que eventualmente se obtengan a un análisis riguroso.

Como consecuencia de la confirmación tan sólo provisional de que es posible reutilizar la levadura en más de un ciclo de fermentación, resulta importante considerar usos alternativos para la levadura; el fondaje tendrá que desecharse tarde o temprano, al menos en las condiciones industriales existentes.

El uso de la levadura para otros fines no es solamente una solución al problema del desperdicio, sino que es también una manera de liberar a las aguas residuales de una carga importante de D.B.O. (Eder, 1976; Sheehan, 1980) porque, en términos industriales, únicamente se aprovechaba la fracción sólida de las aguas residuales de la industria tequilera (Guzmán, 1982), lo mismo que en el caso de otras destilerías (Sheehan, 1980). El agua, separada de una porción considerable de los sólidos previamente disueltos en ella, se vierte entonces al desagüe o a un colector para su tratamiento posterior (Sheehan, 1980), por lo que se abate la contaminación y se previene el proceso de eutroficación de los cuerpos de agua receptores de las descargas de las fábricas de tequila u otros licores. Esto representa un aliciente adicional para la reutilización de la levadura.

El valor de la proteína unicelular (SCP, siglas en Inglés de Simple-Gold Yeast) comienza a reconocerse a nivel general (Bull, 1978).

Debido al interés por parte de las compañías transnacionales en la producción y venta de proteína unicelular a países del Tercer Mundo, se considera importante el desarrollo de una industria nacional con tecnología y patentes propias. Klausner (1984) reporta que la compañía norteamericana Philips está llevando a cabo pruebas de mercado para una marca comercial de proteína unicelular de su propiedad. Las pruebas se realizan con perros de carreras y se tienen conterpladas experiencias, a más largo plazo, con ganado vacuno y porcino. La capacidad de producción de Philips puede estimarse considerando que los fermentadores de 1 500 l actualmente en uso producen 75 t de SCP al año, a un costo de entre .70 y 1.50 dólares por kg (Klausner, 1984). Pero lo más significativo radica en las declaraciones de Gene H. Wegner, gerente de procesos biotecnológicos de Philips: "Los más grandes mercados potenciales para Provesteen (la proteína unicelular patentada por Philips) son los del Tercer Mundo; regiones ricas en petróleo y pobres en alimentos, notablemente el Medio Oriente; Países como Nigeria, México, Argelia, Arabia Saudita y Costa Rica [sic]. Y los países de Sudamérica (ricos en biomasa) son promisorios por no ser mercados libres, sino con subsidios gubernamentales y estímulos fiscales" (Citado por Klausner, 1984). La necesidad de invadir los mercados del Tercer Mundo se ve reforzada por la opinión de Casida (1968) en el sentido de que la levadura para alimento de ganado tiene pocas posibilidades en el caso de los Estados Unidos, ya que los costos son elevados y el producto competiría con el frijol de soja y otros suplementos para ensilaje. No obstante, tales restricciones no operan en las economías planificadas y en los países del Tercer Mundo, en donde podría obtenerse proteína unicelular a partir de melazas (Almazán, 1968; Casida, 1968) para sustituir las proteínas de origen animal, que resultan más caras.

En el caso de los países industrializados, la proteína microbiana se dirige directamente al mercado en forma de aditivos, dado su alto contenido de vitamina B, como un relleno de alimentos como salchichas y tartas, y como proteína texturizada para pastelería (Casida, 1968).

Saccharomyces cerevisiae no se considera como la mejor fuente de proteína unicelular (Harris & Saeman, 1945; Peterson, 1945; Almazán, 1968; Sivarman, 1984; Shay, 1985; Tanaka, 1985). En general, se recomienda el uso de cepas especiales de *Torula* (*Ouidida utilis*), gracias a su habilidad para fermentar una gama más amplia de carbohidratos que *Saccharomyces cerevisiae* (Almazán, 1968; Casida, 1968; Moulin y colaboradores, 1983; Shay, 1985; Tanaka, 1985; Gallardín, 1987). Asimismo, la levadura destinada a la producción de proteína unicelular se obtiene mediante técnicas y procesos específicos (Harris & Saeman, 1945; Peterson, 1945; Moulin y colaboradores, 1983; Pihh, 1984; Tanaka, 1985; Alexander, 1986) y, en algunos casos, se manipula mediante técnicas de ingeniería genética (Klausner, 1984; Gallardín, 1987). Finalmente, Casida (1968) reporta que el rendimiento de *Saccharomyces cerevisiae* como fuente de proteína es a menudo pobre y que *Ouidida utilis* y *C. arborum* resultan rentables a escala comercial.

Fase a todo lo anterior, no hay que perder de vista que esta situación se trata de utilizar un subproducto que en la actualidad se considera como un desecho industrial, por lo que las consideraciones anteriores no se aplican necesariamente en este caso en concreto. *Saccharomyces cerevisiae* tiene un elevado contenido de proteína (Bull, 1970), de lípidos, carbohidratos y vitaminas del complejo B (Casida, 1968; Suomalainén & Oora, 1971; Bull, 1970), y de aminoácidos (Van Ulen, 1971; Phaff, 1971).

Por lo tanto, debe buscársele un uso adecuado a la levadura, tal como lo propone Guzmán (1982), quién reconoce el valor nutritivo de *Saccharomyces cerevisiae* obtenida a partir de los residuos de fermentación, y quien recomienda su uso como un complemento para el forraje del ganado vacuno, ya que por sí sola no aporta la totalidad ni las cantidades apropiadas de los nutrientes necesarios para satisfacer los requerimientos diarios del ganado.

Por último, es importante considerar que el tipo de residuos estudiados no constituyen, de ninguna manera, los únicos desechos aprovechables para la producción de alimentos. Una compilación importante de los esfuerzos más importantes para obtener alimento a partir de subproductos, desperdicios y desechos puede encontrarse en Birch *et al* (1976).

CONCLUSIONES

1. El presente estudio demuestra que, para los fines industriales de reutilización de la levadura, es posible considerar prácticamente como equivalentes los términos "levadura" y "fondaje", dada la muy reducida proporción de bagacillo de agave en el residuo. Esto constituye una ventaja desde el punto de vista industrial, ya que el volumen del material no utilizable se reduce para fines prácticos a cero.

2. La levadura de los fondajes retiene en un alto grado (de alrededor del 90%) la capacidad para fermentar azúcares, a pesar de que se encontró una diferencia estadísticamente significativa en comparación con la levadura fresca. Por lo tanto, la levadura es aún viable.

3. Aunque los resultados obtenidos a partir de las pruebas de eficiencia fermentativa apoyan la hipótesis de que es posible reutilizar la levadura del fondaje dentro del proceso de fermentación en tanque, el alto grado de esporulación de la misma levadura después de completar el primer ciclo de fermentación en el tanque puede introducir una variabilidad no deseada de las características de la levadura.

4. A pesar de que la mayoría de los autores consultados afirman que *Saccharomyces cerevisiae* no es un buen organismo para la producción de proteína unicelular en términos de un proceso industrial cuyo objetivo central sea obtener una elevada cantidad de biomasa a partir de una cantidad razonable de alimento, la utilización de *Saccharomyces cerevisiae* constituye en este caso una oportunidad para obtener un suplemento proteínico a bajo costo. En otras palabras, no resulta rentable

ble su uso en un proceso diseñado especialmente para la producción de proteína unicelular (SCP) (*Ondida utilis* resulta ser una mejor alternativa); pero por ser en este caso un producto secundario, *Saccharomyces cerevisiae* tiene un costo de producción muy reducido, considerando un proceso cuyo fin es la obtención de alcohol etílico y no la producción de biomasa.

RECOMENDACIONES

Se recomienda la realización de estudios que analicen detenidamente la variación de las características metabólicas de la levadura esporulada. De igual manera, se considera necesario llevar a cabo estudios sobre el proceso a escala industrial de la reutilización en tanques y las características organolépticas del tequila producido mediante tal proceso.

Se sugiere el desarrollo de estudios sobre los posibles usos alternativos de los fondajes, ya que a la luz de este trabajo no resulta recomendable la implantación de sistemas de células o enzimas inmovilizadas, como sugieren algunos autores (véase *supra*), debido a los elevados costos de la implantación de tales tecnologías en el caso de la industria tequilera establecida.

Se propone el desarrollo de un extenso programa de producción de proteína unicelular con patentes y tecnologías mexicanas, antes de que el mercado nacional se vea saturado con productos de factura extranjera, sobre todo dentro del marco del reciente ingreso de México al denominado Acuerdo General Sobre Aranceles y Tarifas (G.A.T.T.).

Finalmente, y dentro de un marco más amplio, se recomienda el desarrollo de un programa de investigación sobre la reutilización de todo tipo de desechos, sobrantes y residuos como un medio de estimular el desarrollo nacional y disminuir la dependencia del exterior.

RESUMEN

SE ANALIZO LA CAPACIDAD DE LA LEVADURA *Saccharomyces cerevisiae* Hansen PROVENIENTE DEL RESIDUO DE LA FERMENTACION ALCOHOLICA EN TANQUE DEL TEQUILA, BAJO CONDICIONES DE LABORATORIO, CON EL OBJETO DE ESTUDIAR LA POSIBILIDAD DE SU REUTILIZACION DENTRO DEL PROCESO DE FERMENTACION INDUSTRIAL. LA EFICIENCIA FERMENTATIVA DE LA LEVADURA DE LOS RESIDUOS RESULTO SER SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTE, EN TERMINOS ESTADISTICOS, CON RESPECTO A LA LEVADURA CONTROL, LA CUAL CORRESPONDIO AL INOCULO FRESCO UTILIZADO EN EL PROCESO REAL DE FERMENTACION EN TANQUE. LA EFICIENCIA PROMEDIO DE LA LEVADURA DEL RESIDUO RESULTO INFERIOR EN UN 10% AL RENDIMIENTO OBTENIDO POR LA LEVADURA DE INOCULO FRESCA. SE ENCONTRO QUE LA LEVADURA PROVENIENTE DEL RESIDUO CONTENIA UNA ELEVADA PROPORCION DE ESPORAS. SE RECOMIENDA LA REALIZACION DE ESTUDIOS COMPLEMENTARIOS ANTES DE LLEVAR A CABO LA REUTILIZACION DE LA LEVADURA PARA LA FERMENTACION DEL TEQUILA. SE HACE UNA REVISION DE USOS ALTERNATIVOS PARA LA LEVADURA RESIDUAL.

APENDICE. TABLAS.

TABLA # 1. LEVADURA PROBLEMA.

BRIX DE CARGA DEL MOSTO (SIN CORREGIR)

n= 97 \bar{x} = 14.5° Brix s^2 = 0.0000

BRIX DE HUERTE DEL MOSTO (SIN CORREGIR)

n= 97 \bar{x} = 2.20° Brix s^2 = 0.0147

GRADO DE ABATIMIENTO (SIN CORREGIR)

n= 97 \bar{x} = 12.3° Brix s^2 = 0.0146

EFICIENCIA PORCENTUAL (SIN CORREGIR)

n= 97 \bar{x} = 84.80% s^2 = 0.7335

TABLA # 2. LEVADURA PROBLEMA.

BRIX DE CARGA DEL MOSTO (CORREGIDO A 20°C)

n= 97 \bar{x} = 14.625° Brix s^2 = 0.0479

GRADO DE ABATIMIENTO (CORREGIDO A 20°C)

n=97 \bar{x} = 12.312° Brix s^2 = 0.0151

BRIX DE HUERTE DEL MOSTO (CORREGIDO A 20°C)

n= 97 \bar{x} = 2.33° Brix s^2 = 0.0167

EFICIENCIA PORCENTUAL CORREGIDA

n= 97 \bar{x} = 81.189% s^2 = 0.7565

TABLA # 3. LEVADURA CONTROL.

BRIX DE CARGA DEL MOSTO (SIN CORREGIR)

n= 22 \bar{x} = 14.5° Brix s^2 = 0.0000

BRIX DE HUERTE DEL MOSTO (SIN CORREGIR)

n= 22 \bar{x} = 0.92° Brix s^2 = 0.0273

TABLA # 3. CONTINUACION

GRADO DE ABATIMIENTO (SIN CORREGIR)

n= 22 \bar{x} = 13.58° Brix s^2 = 0.0273

EFICIENCIA PORCENTUAL (SIN CORREGIR)

n= 22 \bar{x} = 93.66% s^2 = 1.297

TABLA # 4. LEVADURA CONTROL

BRIX DE CARGA DEL MOSTO (CORREGIDO A 20°C)

n= 22 \bar{x} = 14.619° Brix s^2 = 0.0028

BRIX DE MUERTE DEL MOSTO (CORREGIDO A 20°C)

n= 22 \bar{x} = 1.01° Brix s^2 = 0.0208

GRADO DE ABATIMIENTO (CORREGIDO A 20°C)

n= 22 \bar{x} = 13.611° Brix s^2 = 0.0295

EFICIENCIA PORCENTUAL CORREGIDA

n= 22 \bar{x} = 93.08% s^2 = 0.9514

TABLA # 5. RIQUEZA ALCOHOLICA DE LOS MOSTOS (CORREGIDA A 20°C)

LEVADURA PROBLEMA

n= 97 \bar{x} = 5.342° Gay Lussac s^2 = 0.0027

LEVADURA CONTROL

n= 22 \bar{x} = 5.908° Gay Lussac s^2 = 0.0055

TABLA # 6. GRADOS BRIX DE MUERTE DE LOS MOSTOS (CORREGIDA A 20°C)

LEVADURA PROBLEMA

n= 97 \bar{x} = 2.31° Brix s^2 = 0.0167

LEVADURA CONTROL

n= 22 \bar{x} = 1.01° Brix s^2 = 0.0202

BIBLIOGRAFIA

- ALMAZAN, O. 1968. UTILIZACION DE LOS MOSTOS RESIDUALES PARA LA PRODUCCION DE LEVADURA Y DE FORRAJE, ICIDCA, 2 (2): 17-26.
- ALEXANDER, N. 1986. GENETIC MANIPULATION OF YEAST FOR ETHANOL PRODUCTION FROM XYLOSE, Food Technology, 40 (10): 99-103.
- AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY. 1984. MANUAL OF METHODS FOR BACTERIOLOGY, A.S.M., Washington D.C., 524 pp.
- AVALES SANCHEZ, T. 1987. DETERMINACION DE LAS CONDICIONES OPTIMAS PARA EL DESARROLLO DE UNA LEVADURA UTILIZADA EN LA ELABORACION DEL TEQUILA Y PARA MEJORAR LA EFICIENCIA DE LA FERMENTACION ALCOHOLICA, Trab. Profesional, Facultad de Ciencias Químicas, U. de G., 72 pp.
- BATT, C. 1984. USE OF BIOTECHNOLOGY IN THE PRODUCTION OF SINGLE CELL PROTEIN, Food Technology, 38 (2): 108-111.
- BIRCH, G.G., PARKER, F.J. y MORGAN, J.T. 1976. FOOD FROM WASTE, Applied Science Publ. LTD., London, 659 pp.
- BUCKLAND, B.C. 1984. TRANSLATION OF SCALE IN FERMENTATION PROCESSES; THE IMPACT OF COMPUTER PROCESS CONTROL, Biotechnology, 2 (10): 875-883.
- BULL, H.J. 1978. PROGRESS IN INDUSTRIAL MICROBIOLOGY, Elsevier, Amsterdam, 293 pp.
- BRYANT, T.H.; COWAN, W.D. 1979. CLASSIFICATION OF BREWING YEASTS BY PRINCIPAL BREWING PROPERTIES, Journal of the Institute of Brewing, 85 (2): 87-91.
- CASIDA, I.F. JR. 1968. INDUSTRIAL MICROBIOLOGY, John Wiley and Sons, Inc., Nueva York, 517 pp.

- CHUO, T. 1986. MULTIMEMBRANE REACTOR FOR EXTRACTIVE FERMENTATION, Biotechnology, 2 (1): 53-60.
- EDER, V. 1976. TRATAMIENTO Y APROVECHAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES EN FABRICAS DE LEVADURA Y ALCOHOL, Ingeniería Química, S/N: 103-111.
- FISH, H.M. 1984. THE INTERACTIONS BETWEEN FERMENTATION AND PROTEIN RECOVERY, Biotechnology, 2 (7): 623-627.
- FUCH, R. 1971. EFFECT OF SURFACE AERATION ON SCALE-UP PROCEDURES FOR FERMENTATION PROCESSES, Industrial Eng. Chem. Progress. Des. Develop., 10 (2): 190-196.
- GAILLARDIN, C. 1987. LA LEVURE, La Recherche, 18 (188): 586-601.
- GUIDOBONI, G.E. 1984. CONTINUOUS FERMENTATION SYSTEMS FOR ALCOHOL PRODUCTION, Enzyme Microb. Tech., 6 (5): 194-200.
- GUILLERMOND, A. 1919. THE YEASTS, John Wiley and Sons Inc., Londres, 424 pp.
- GUILLOT, G. 1986a. LES TECHNIQUES DE FERMENTATION: QUELS PROBLEMS, QUELS CHOIX?, Le Technoscope de Biofutur, 1 (1): 3-9.
- GUILLOT, G. 1986b. CONTROLE DES FERMENTATIONS: LES OUTILS D'AUXILIERAUI, Le Technoscope de Biofutur, 1 (2): 3-9.
- GUEZAN PAREDES, C.H. 1982. APROVECHAMIENTO DE LOS RESIDUOS DE FERMENTACION DE LA INDUSTRIA TEQUILERA COMO COMPLEMENTO DE ALIMENTOS BALANCEADOS PARA GANADO, Tesis Profesional, Facultad de Ciencias Químicas, U. de G., 79 pp.
- HARRIS, E.E. y SALMAN, J.F. 1945. FOODER YEEST FROM WOOD HYDROLYZATES AND STILL RESIDUES, Industrial and Engineering Chemistry, 40 (7): 165-167.

- IVANOVA, L.A.; TOYMAN, L.M. y KOVALENICH, L.S. 1975. STUDY OF THE EFFECT OF FERMENTATION TEMPERATURE AND SEEDING AREA ON FERMENTATION ENERGY AND INCREASE IN THE BIOMASS OF THE YEAST *Saccharomyces carlsbergensis* p. 776. Prilozhnikh Mikrobiol. 11 (1): 71-78.
- JAGADISH, M.N. y CARTER, D.L.A. 1978. EFFECTS OF TEMPERATURE AND NUTRITIONAL CONDITIONS ON THE MITOTIC CELL CYCLE OF *Saccharomyces cerevisiae*, Journal of Cell Science, 31(3): 71-78.
- JANSENS, S. y BERNARD, A. 1984. ETHANOL FROM WHEY; CONTINUOUS FERMENTATION WITH CELL RECYCLE. Biotechnology and Bioengineering, 26: 001-005.
- YAZANTZEV, E.N.; VOLPACHKI, A.P. y PATEL, N.H. 1979. THE EFFECT OF LONG, CONTINUOUS FERMENTATION ON THE MORPHOLOGY AND PHYSIOLOGY OF FIXED YEASTS CELLS, Mikrobiologiya, 48 (2):296-301.
- KLAUSNER, A. 1984. PHILIPS: WILDCATTING IN BIOTECHNOLOGY, Biotechnology, 2 (10): 875-883.
- HANNERS, D.J. 1971. THE STRUCTURE AND BIOSYNTHESIS OF STORAGE CARBOHYDRATES IN YEASTS, THE YEASTS, ROSE, A.H. y HARRISON, J.S., Vol. 2, Academic Press, London, 571 pp.
- HARHANA, S.A. 1984. ETHANOL PRODUCTION FROM WHEY PERMEATE BY IMMOBILIZED YEAST CELLS, Enzyme Microbial Technology, 6 (1): 18-22.
- HATALES, R.I. y TANNENBAUM, S.R. 1968. SINGLE CELL PROTEIN, MIT Press, Massachusetts, 356 pp.
- MENDOZA, I.A. 1977. CONTROL DE CALIDAD Y SELECCION DE LEVADURA EN LA INDUSTRIA TEQUILERA, Tesis Profesional, Facultad de Ciencias Químicas, U. de G., 96 pp.
- HOPE-LANDSCOVER, E. 1982. FUNDAMENTALS OF THE FUNGI, Prentice Hall, Englewood Cliffs, 578 pp.

- MOULIN, G. y HALIGE, B. 1983. PRODUCCION DE LEVADURAS RICAS EN AMINOACIDOS A PARTIR DE SUEROS DE QUESO, Journal of Dairy Sc., 66 (1): 21-28.
- MAGODAWITHANA, T.W.; CASTELLANO, C. y STEINKRAUSS, K.H. 1974. EFFECT OF DISSOLVED OXYGEN, TEMPERATURE, INITIAL CELL COUNT, AND SUGAR CONCENTRATION ON THE VIABILITY OF *Saccharomyces cerevisiae* IN RAPID FERMENTATIONS, Applied Microbiology, 28 (3): 380-391.
- NAVARRO, J.M. 1981a. IMMOBILIZATION OF *Saccharomyces uvarum* BY ADSORPTION TO BRICK GRANULES, Science Des Aliments, 1 (4): 513-528.
- NAVARRO, J.M. 1981b. IMMOBILIZATION OF *Saccharomyces uvarum* BY COVALENT COUPLING WITH SILICA, Science Des Aliments, 1 (4): 529-540.
- HARRIS, J.R. 1981. SINGLE-CELL PROTEIN PRODUCTION, Essays in Applied Microbiology, 5/1: 1-31.
- OHATA, T. 1985. BEER BREWING WITH IMMOBILIZED YEAST, Biotechnology, 3 (5): 467-470.
- PHAFF, H.J. 1971. STRUCTURE AND BIOSYNTHESIS OF THE YEAST ENVELOPE, THE YEASTS, ROSE, A.H. y HARRISON, J.S., Vol. 2, Academic Press, Londres, 571 pp.
- PETERSON, W.H. 1945. FODDER YEAST FROM SUGAR, Industrial Engineering Chemistry, 37 (1): 30-35.
- QUEIROZ, H. y VAIRO, M. 1983. INFLUENCE OF INITIAL YEAST AND SUGAR CONCENTRATION ON THE QUALITY OF YEAST PRODUCED IN BATCH ETHANOL FERMENTATION OF SUGAR-CANE BLACK STRAW MOLASSES, Journal of Fermentation Technology, 61 (2): 215-218.
- RANKINE, B.C. 1978. PROGRESS IN THE SELECTION AND USE OF PURE YEAST IN GENOLOGY/ ACQUISITIONS RECENTES DANS LA SELECTION ET L'UTILISATION DES SOUCHES DE LEVURES PURES EN GENOLOGY, Annuaire of Technology and Agriculture, 27 (1): 189-200.

- REYES, R. 1975. BIOESTADÍSTICA APLICADA, Trillas, México, 216 pp.
- ROSE, A.H. y HARRISON, J.S. 1969. THE YEASTS, Vol. 1, Academic Press, Londres, 603 pp.
- ROSE, A.H. y HARRISON, J.S. 1971. THE YEASTS, Vol. 2, Academic Press Londres, 571 pp.
- ROSEN, K. 1978. CONTINUOUS PRODUCTION OF ALCOHOL, Process Biochemistry, 13 (5): 25-26.
- RUNIO, R.H. y LAMAS, H.E. 1978. ESTUDIOS SOBRE LEVADURAS DE ALTA FERMENTACION EN LA PRODUCCION DE ALCOHOL, Tesis Profesional, Facultad de Ciencias Químicas, U. de G., 28 pp.
- SAITA, H. 1984. ACCELERATION OF THE RATE OF FERMENTATION BY *Saccharomyces cerevisiae* IN THE PRESENCE OF AMMONIUM ION, Enzyme Microbial Technology, 6 (8): 372-375.
- SANCHEZ, A. 1980. ANÁLISIS DE LA CAPACIDAD DE CONTROL DE CARACTERÍSTICAS VARIABLES DE CALIDAD EN LA INDUSTRIA TEQUILERA, Tesis Profesional, Facultad de Ciencias Químicas, U.de G., 69 pp.
- SHAY, D.K. 1965. IMPROVED FERMENTATION PROCESS FOR PRODUCING TORULA YEAST. TORULA YEAST, A HIGH QUALITY PROTEIN SUPPLEMENT, CAN BE PRODUCED FROM ETHANOL, SUCROSE OR MOLASSES USING AN ADVANCED CONTINUOUS FERMENTATION PROCESS, Food Technology, 39 (10): 61-66.
- SHEEHAN, G.S. 1980. UTILIZATION, TREATMENT AND DISPOSAL OF DISTILLERY WASTEWATER, Water Research, 14: 257-277.
- SIVAPAN, H. 1984. GROWTH OF *Candida utilis* ON DISTILLERY EFFLUENT, Biotechnology Letters, 6 (11): 759-762.
- SYHALAINEN, H. y OURA, E. 1971. YEAST NUTRITION AND SOLUTE UPTAKE, THE YEASTS, ROSE, A.H. y HARRISON, J.S., Vol. 2, Academic Press, Londres. 571 pp.

- TANAKA, H. 1985. COVERSION OF LIGNOCELLULOSIC MATERIALS TO SINGLE CELL PROTEIN (SCP): RECENT DEVELOPMENTS AND PROBLEMS. Enzyme Microbial Technology, 7 (5): 197-206.
- ULLOA, H.; SANCHEZ POSADA, E. y HERRERA, T. 1982. IDENTIFICACION DE *Saccharomyces cerevisiae* EN EL MOSTO DEL QUE SE DESTILA EL MEZCAL DE OAXACA, MEXICO, Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología, 17 (25): 25-32.
- VAN UDEH, H. 1971. KINETICS AND ENERGETICS OF YEAST GROWTH, THE YEASTS, ROSE, A.H. y HARRISON, J.S., Vol. 2, Academic Press, Londres, 571 pp.